

# 4

⑫

# **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

⑲ Anmeldenummer: 87890135.4

⑤① Int. Cl. 4: **A 61 K 39/104**  
**A 61 K 39/40**

⑳ Anmeldetag: 15.06.87

③① Priorität: 24.06.86 AT 1716/86

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
07.01.88 Patentblatt 88/01

⑥④ Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB IT LI LU NL SE

⑦① Anmelder: **IMMUNO Aktiengesellschaft für  
chemisch-medizinische Produkte**  
Industriestrasse 72  
A-1220 Wien (AT)

⑦② Erfinder: **Dörner, Friedrich, Prof. Dr.**  
Peterlinigasse 17  
A-1230 Wien (AT)

**Eibl, Johann, Dr.**  
Gustav Tschermakgasse 2  
A-1180 Wien (AT)

⑦④ Vertreter: **Wolfram, Gustav, Dipl.-Ing.**  
Schwindgasse 7 P.O. Box 205  
A-1041 Wien (AT)

⑤④ Gegen *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen wirksame Präparationen und Verfahren zu ihrer Herstellung.

⑤⑦ Es werden gegen *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen wirksame Präparationen, u.zw. Vakzine zur aktiven Immunisierung sowie Antikörper enthaltende, zum passiven Schutz bestimmte Präparationen und Verfahren zu deren Herstellung beschrieben.

Die Vakzine enthalten protektive Flagella(H)-Antigene vom H-Serotyp a und b, welche aus monomeren Bestandteilen bestehen, jeder monomere Bestandteil aus bestimmten Aminosäuren mit einer bestimmten N-terminalen Aminosäuresequenz aufgebaut ist und ein bestimmtes Molekulargewicht aufweist. Die Vakzine werden aus gereinigten Flagella(H)-Antigen-Lösungen hergestellt. Die Immunglobulin G-hältigen Präparationen enthalten aus dem Blutplasma von mit protektiven Flagella(H)-Antigenen immunisierten menschlichen Spendern bzw. Säugetieren gewonnene Flagella(H)-Antikörper. Sie können durch Affinitätschromatographische Verfahren gereinigt werden.

**EP 0 252 064 A2**

**B schreibung**Gegen Pseudomonas aeruginosa Infektionen wirksame Präparationen und Verfahren zu ihrer Herstellung

Die Erfindung betrifft gegen Pseudomonas aeruginosa-Infektionen wirksame Präparationen. Im besondern betrifft die Erfindung Vakzine, die protektive Pseudomonas aeruginosa Flagella(H)-Antigene enthalten und zur aktiven Immunisierung bestimmt sind, sowie Immunglobulin-G-hältige, gegen Bakterium Pseudomonas aeruginosa-Infektionen wirksame Präparationen, die zum passiven Schutz bestimmt sind.

Bakterium Pseudomonas aeruginosa ist ein opportunistischer, pathogener Keim, der häufig bei Krankenhausinfektionen auftritt, hauptsächlich bei Patienten mit geschwächter Immunabwehr, wie bei Verbrennungspatienten, bei Personen, die an cystischer Fibrose leiden oder organische Fehlfunktionen aufweisen, und bei Tumorpatienten. Antibiotika sind gegen Pseudomonasinfektionen infolge des Auftretens von Resistenzen nur beschränkt wirksam, weshalb man bemüht ist, immunologische Methoden zur Bekämpfung von Infektionen durch Pseudomonas aeruginosa zu finden.

Infektionen können durch eine Vielzahl von Stämmen ausgelöst werden, die O-Gruppenantigene und H-Antigene produzieren. Gemäß dem H-Antigenschema nach Ansorg (Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 242, 228-238 (1978) wird unter Verwendung der indirekten Immunfluoreszenztechnik bei Pseudomonas aeruginosa ein komplexes Flagella(H)-Antigen a mit den Partialantigenen a<sub>0</sub>, a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, a<sub>3</sub>, a<sub>4</sub> und ein uniformes Flagella(H)-Antigen b differenziert. Die Partialfaktoren a<sub>0</sub>-a<sub>4</sub> sind unabhängige Determinanten, so daß ein flagellares Antigeneschema mit mehreren H-Typen resultiert. O-Gruppen und H-Typ zeigen freie Kombinationen.

Die zur Bereitung von Pseudomonas aeruginosa-Bakterienkulturen verwendeten Stämme und die produzierten Antigene sind in der folgenden Tabelle 1 angeführt.

Tabelle 1

		<u>Stamm</u>		<u>H-Typ</u>
30	1	170001	-	b
		M-2	-	b
	2	5142	-	a <sub>0</sub>
35	3	5940	-	a <sub>0</sub> , a <sub>2</sub>
	4	5939	-	a <sub>0</sub> , a <sub>3</sub>
	5	5933	-	a <sub>0</sub> , a <sub>1</sub> , a <sub>2</sub>
40		1210	-	a <sub>0</sub> , a <sub>1</sub> , a <sub>2</sub>
		16990	-	a <sub>0</sub> , a <sub>1</sub> , a <sub>2</sub>
45	6	170018	-	a <sub>0</sub> , a <sub>3</sub> , a <sub>4</sub>

Isolierte Filamente der Flagellen-Antigene, die durch Schütteln, Homogenisieren und anschließendes Zentrifugieren gewonnen werden können (R. Ansorg, W. Schmitt, Med. Microbiol. Immunol. (1980) 168: 217-226), bestehen aus Flagellen und Flagellenbruchstücken, vereint in einem Komplex bestehend aus Lipopolysacchariden (LPS) und Verunreinigungen aus dem Nährmedium; solche Präparationen sind naturgemäß pyrogen und ungeeignet für die Anwendung am Menschen.

In der PCT-Veröffentlichung WO 86/03974 ist die Struktur von nach einem Reinigungsverfahren gewonnenen polydispersen nativen Pseudomonas-Flagella(H)-Antigenen (Fag) beschrieben, die frei sind von pyrogenen Substanzen. Sie bestehen aus monomeren Bestandteilen, wobei jeder monomere Bestandteil

- folgende Aminosäuren: Asparaginsäure bzw. Asparagin (Asp/Asn), Threonin (Thr), Serin (Ser), Glutaminsäure bzw. Glutamin (Glu/Gln), Glycin (Gly), Alanin (Ala), Valin (Val), Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Tyrosin (Tyr), Phenylalanin (Phe), Lysin (Lys), Arginin (Arg) und gegebenenfalls Tryptophan (Trp) enthält,
- die N-terminale Aminosäuresequenz Ala-Leu-Thr-Val-Asn-Thr-Asn-Ile-Ala- aufweist,
- ein Molekulargewicht zwischen 43.500 und 53.050 aufweist und

- frei ist von Prolin (Pro), Methionin (Met), Halb-Cystin (1/2 Cys) und Histidin (His).

Weiterhin sind die einzelnen Flagella(H)-Antigentypen dadurch gekennzeichnet, daß die monomeren Formen die Aminosäuren Asparagin/-säure, Threonin, Serin, Glutamin/-säure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin in bestimmten Verhältnissen zueinander enthalten. In Tabelle 2 sind diese Verhältniszahlen und die Molekulargewichte der monomeren Flagella(H)-Antigene angeführt.

Tabelle 2

A n z a h l   A S / M o l e k ü l   F l a g e l l i n

Stämme mit zugehörigem H-Serotyp

Aminosäuren	170018	5939	5142	M-2	1210	5940
Asparaginsäure	64	69	74	74	76	68
Threonin	33	35	50	48	44	41
Serin	35	38	49	48	40	37
Glutaminsäure	42	44	49	49	52	46
Glycin	44	47	49	51	50	44
Alanin	68	73	89	91	81	73
Valin	29	30	37	38	32	29
Isoleucin	29	30	29	30	32	29
Leucin	37	60	44	43	41	37
Tyrosin	3	3	5	4	4	3
Phenylalanin	10	12	14	13	12	10
Lysin	19	21	17	18	20	16
Arginin	15	16	16	18	18	16
$\Sigma$	450	478	522	525	502	449
MG =	43.500	46.700	52.720	53.050	51.250	45.900

Gemäß den Angaben in der PCT Veröffentlichung WO 86/03974 werden zur Gewinnung der polydispersen

nativen *Pseudomonas aeruginosa* Flagella(H)-Antigene Bakterienkulturen in Minimalmedium angezüchtet und anschließend mit einem Detergens behandelt, wonach die Flagella(H)-Antigene aus der Kultur abgetrennt werden. Dabei kann die Bakterienkultur entweder vor der Detergensbehandlung disintegriert und einem Scherprozeß unterworfen werden oder in Gegenwart des Detergens in der Bakterienmasse bewirkt; die sich dann in Lösung befindlichen Antigene können abgetrennt werden.

Anschließend können die, wie oben beschrieben, von der Bakterienmasse abgetrennten Antigene durch eine chromatographische Reinigung von anhaftenden Verunreinigungen wie Lipopolysacchariden, Nucleinsäuren, Salzen, Polysacchariden u.a. befreit werden. Das noch vorhandene Detergens kann durch einen weiteren säulenchromatographischen Reinigungsschritt entfernt werden.

Es war bisher nicht bekannt, ob diese Antigene protektive Wirkung haben oder nicht. Es wurde nun gefunden, daß allen Flagella(H)-Antigenen der in der PCT Veröffentlichung WO 86/03974 beschriebenen Typen protektive Wirkung zukommt, so daß die Herstellung bzw. Bereitstellung von monovalenten und polyvalenten Vakzinen möglich ist. Diese Aufgabe liegt der vorliegenden Erfindung zugrunde.

Im besonderen ist es ein Ziel der Erfindung, eine aktive Immunprophylaxe gegen Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* zu ermöglichen, insbesondere für Personengruppen, die ein hohes Risiko haben, Verbrennungen zu erleiden, z.B. für Angehörige von Feuerwehren oder militärisches Personal oder Patienten, die mit Immunsupprimierenden Medikamenten behandelt werden sollen.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, Immunglobulin G-hältige Präparationen zur Verfügung zu stellen, die zur passiven Immunisierung bei *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen geeignet sind.

Die erfindungsgemäßen Vakzine sind dadurch gekennzeichnet, daß sie protektive Flagella(H)-Antigene vom H-Serotyp a bzw. b enthalten, welche aus monomeren Bestandteilen bestehen, wobei jeder monomere Bestandteil

a) folgende Aminosäuren: Asparaginsäure (Asp), Threonin (Thr), Serin (Ser), Glutaminsäure (Glu), Glycin (Gly), Alanin (Ala), Valin (Val), Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Tyrosin (Tyr), Phenylalanin (Phe), Lysin (Lys), Arginin (Arg) und gegebenenfalls Tryptophan (Trp) und Methionin (Met) enthält,

b) die N-terminale Aminosäuresequenz Alanin (Ala) - Leucin (Leu) - Threonin (Thr) - Valin (Val) - Asparagin (Asn) - Threonin (Thr) - Asparagin (Asn) - Isoleucin (Ile) - Alanin (Ala) - aufweist,

c) ein Molekulargewicht zwischen 43.500 und 53.050 aufweist und

d) frei ist von Prolin, Halb-Cystin und Histidin und daß sie frei sind von pyrogenen Substanzen.

Im einzelnen werden erfindungsgemäß sechs spezifische H-Serotypen als Komponenten von Vakzinen charakterisiert, u.zw.

- das Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp a<sub>0</sub>, a<sub>3</sub>, a<sub>4</sub>, dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 64 : 33 : 35 : 42 : 44 : 68 : 29 : 29 : 37 : 3 : 10 : 19 : 15 enthält und ein Molekulargewicht von 43.500 aufweist;

- das Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp a<sub>0</sub>, a<sub>3</sub>, dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 69 : 35 : 38 : 44 : 47 : 73 : 30 : 30 : 60 : 3 : 12 : 21 : 16 enthält und ein Molekulargewicht von 46.700 aufweist;

- das Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp a<sub>0</sub>, dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 74 : 50 : 49 : 49 : 89 : 37 : 29 : 44 : 5 : 14 : 17 : 16 enthält und ein Molekulargewicht von 52.720 aufweist;

- das Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp b, dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 74 : 48 : 48 : 49 : 51 : 91 : 38 : 30 : 43 : 4 : 13 : 18 : 18 enthält und ein Molekulargewicht von 53.050 aufweist;

- das Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp a<sub>0</sub>, a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 76 : 44 : 40 : 52 : 50 : 81 : 32 : 32 : 41 : 4 : 12 : 20 : 18 enthält und ein Molekulargewicht von 51.250 aufweist;

- das Flagella(H)-Antigen vom H-Serotyp a<sub>0</sub>, a<sub>2</sub>, dessen monomere Form die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 68 : 41 : 37 : 46 : 44 : 73 : 29 : 29 : 37 : 3 : 10 : 16 : 16 enthält und ein Molekulargewicht von 45.900 aufweist.

Ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Vakzine ist dadurch gekennzeichnet, daß ein aus Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa* gewonnenes, gereinigtes Flagella(H)-Antigen sterilfiltriert, gegebenenfalls mit einem Adjuvans, wie Al(OH)<sub>3</sub> vermischt und gewünschtenfalls mit einem Präservans, wie Merthiolat, versetzt wird.

Weiters umfaßt die Erfindung Immunglobulin G-hältige, gegen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen wirksame Präparationen zur prophylaktischen und therapeutischen Anwendung, welche dadurch gekennzeichnet sind, daß sie aus dem Blutplasma von mit protektiven Flagella(H)-Antigenen immunisierten menschlichen Spendern bzw. Säugetieren gewonnene Flagella(H)-Antikörper enthalten.

Diese Flagella(H)-Antikörper besitzen eine motilitätshemmend Wirkung sowie die Fähigkeit einer erhöhten

Phagocytose und einer erhöhten intrazellulären Abtötung von *Pseudomonas aeruginosa*-Bakterien.

Nach bevorzugten Ausführungsformen können diese Immunglobulin G-hältigen, gegen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen wirksamen Präparationen dadurch hergestellt werden, daß Plasma von mit protektiven Flagella(H)-Antigenen immunisierten menschlichen Spendern bzw. Säugetieren mit Proteinfällungsmitteln, wie Ammoniumsulfat, behandelt, die ausgefällte Immunglobulin G-hältige Fraktion gelöst und gereinigt wird, wobei vorteilhaft die Reinigung der Immunglobulin G-hältigen Fraktion durchgeführt wird, indem die Lösung über ein Trägermedium geleitet wird, an welchem gereinigtes Flagella-Antigen in monomerer oder polymerer Form kovalent gebunden ist, die flagellenspezifischen Antikörper durch pH-Änderung oder chaotrope Agentien, wie  $\text{NH}_4\text{SCN}$ , vom Gel eluiert und in eine galenische Zubereitung formuliert werden.

Die Erfindung wird durch folgende Beispiele näher erläutert, wobei die Beispiele 1 bis 3 die Herstellung von Vakzinen und Beispiel 4 die Herstellung von Immunglobulin G-hältigen Präparationen veranschaulichen.

#### Beispiel 1:

##### Vakzine-Formulierung für eine *Pseudomonas aeruginosa* M-2 Flagellenvakzine

Eine aus Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* M-2-Kultur gewonnene und in oben beschriebener Weise durch Detergensbehandlung, Scheren und chromatographische Behandlung gereinigte Flagellenlösung wurde mit destilliertem pyrogenfreiem Wasser auf eine Proteinkonzentration von 100 µg/ml eingestellt und durch Zugabe von festem Natriumchlorid und Merthiolat (Endkonzentration 0,9 % NaCl bzw. 0,01 % Merthiolat) isoton gemacht. Anschließend wurde die Lösung durch Sartorius-Einmalfilter (0,2 µm) sterilfiltriert.

Nach einer Proteinbestimmung der sterilfiltrierten Probe wurde die Flagellensuspension mit steriler NaCl/Merthiolatlösung (0,9 %/0,01 %) auf 25 µg Protein/ml eingestellt und anschließend durch Zugabe einer 1 % Aluminiumhydroxidsuspension in steriler NaCl/Merthiolatlösung auf 20 µg Protein/ml verdünnt.

Die fertig adjuvantierte Vakzine enthielt pro ml:

20 µg Flagellenprotein

2 mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$

9 mg NaCl

0,1 mg Merthiolat als Stabilisator.

#### Beispiel 2:

##### Vakzine-Formulierung für eine *Pseudomonas aeruginosa* 1210 Flagellenvakzine

Eine aus Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* 1210-Kultur gewonnene und in oben beschriebener Weise durch Detergensbehandlung, Scheren und chromatographische Behandlung gereinigte Flagellenlösung wurde mit destilliertem pyrogenfreiem Wasser auf eine Proteinkonzentration von 100 µg/ml eingestellt und durch Zugabe von festem Natriumchlorid und Merthiolat (Endkonzentration 0,9 % NaCl bzw. 0,01 % Merthiolat) isoton gemacht. Anschließend wurde die Lösung durch Sartorius-Einmalfilter (0,2 µm) sterilfiltriert.

Nach einer Proteinbestimmung der sterilfiltrierten Probe wurde die Flagellensuspension mit steriler NaCl/Merthiolatlösung (0,9 %/0,01 %) auf 25 µg Protein/ml eingestellt und anschließend durch Zugabe einer 1 % Aluminiumhydroxidsuspension in steriler NaCl/Merthiolatlösung auf 20 µg Protein/ml verdünnt.

Die fertig adjuvantierte Vakzine enthielt somit pro ml:

20 µg Flagellenprotein

2 mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$

9 mg NaCl

0,1 mg Merthiolat als Stabilisator

#### Beispiel 3:

##### Vakzine-Formulierung für eine *Pseudomonas aeruginosa* polyvalente Flagellenvakzine

Aus Bakterien *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen der Typen M-2, 1210, 5142, 5939, 5940 und 170018 gewonnene, in oben beschriebener Weise durch Detergensbehandlung, Scheren und chromatographische Behandlung gereinigte Flagellenlösungen wurden mit destilliertem pyrogenfreiem Wasser auf eine Proteinkonzentration von jeweils 100 µg/ml eingestellt, zu gleichen Teilen vermischt und durch Zugabe von festem Natriumchlorid und Merthiolat (Endkonzentration 0,9 % NaCl bzw. 0,01 % Merthiolat) isoton gemacht. Anschließend wurde durch Sartorius-Einmalfilter (0,2 µm) sterilfiltriert.

Nach einer Proteinbestimmung der sterilfiltrierten Probe wurde die Flagellensuspension mit steriler NaCl/Merthiolatlösung (0,9 %/0,01 %) auf 25 µg Protein/ml eingestellt und anschließend durch Zugabe einer 1 % Aluminiumhydroxidsuspension in steriler NaCl/Merthiolatlösung auf 20 µg Protein/ml verdünnt.

Die fertig adjuvantierte Vakzine enthielt somit pro ml:

20 µg Flagellenproteine

2 mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$

9 mg NaCl

0,1 mg Merthiolat als Stabilisator

## Beispiel 4:

## Pyrogentest

5 In beschriebener Weise bereitete Vakzine wurde auf das Freisein von pyrogenen Bestandteilen geprüft. Das Versuchsprinzip besteht darin, daß nach der i.v.-Injektion des Produktes in drei oder mehr gesunde, aus gewachsene Kaninchen drei Stunden lang die Temperatur gemessen wird (Eur. Ph., 2nd Ed., 1980, Part 1, V.2.1.4.); der maximale Temperaturanstieg wird für jedes Kaninchen aufgezeichnet und gilt als ein Maß für die Pyrogenität des Produktes.

Für die Durchführung des Versuches wurden verwendet:

10 Thermoden (Cu-Konstantan Thermoelemente für Kaninchen, Ph-Schenk); Temperaturschreiber (Sechsfarbenpunktdrucker Type STD 62A, Meßbereich 36 bis 42°C, Meßgenauigkeit  $\pm 0,08^\circ\text{C}$ ); sterile, pyrogenfreie Plastikinjektionsspritzen; sterile, pyrogenfreie Injektionsnadel; Stahlpyrogentestbox mit Halsfixierung; Wagen für sechs Pyrogentestboxen; Wasserbad mit Thermostat; Thermometer; Waage: Sauter ES 120.

15 Als Versuchstiere wurden gesunde, ausgewachsene Kaninchen beiderlei Geschlechts eingesetzt, die mindestens 1500 g wogen, mit einer vollwertigen antibiotikafreien Standarddiät gefüttert wurden und in der dem Versuch vorausgegangenen Woche keinen Gewichtsabfall zeigten.

Als Probe wurde eine nicht adjuvantierte M2-Flagellenvaccine verwendet und vor der Injektion auf etwa 38°C erhitzt. Der Versuch wurde mit einer Gruppe von drei Kaninchen durchgeführt, die mindestens 90 min vor Testbeginn in die Pyrogentestboxen gebracht wurden.

20 Für jedes Kaninchen wurde als Anfangstemperatur der Mittelwert aus zwei in einem Abstand von 30 min und in dem Bereich von 40 min vor Verabreichung der Prüflösung erfolgenden Temperaturmessungen bestimmt; Kaninchen, die bei der Bestimmung der Anfangstemperatur zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messungen eine größere Temperaturabweichung als 0,2°C zeigten, wurden nicht für den nachfolgenden Versuch eingesetzt. Für die Prüfung wurden nur Kaninchen eingesetzt, die sich in ihrer Anfangstemperatur um nicht 25 mehr als 0,1°C unterschieden. Alle Kaninchen, die eine Anfangstemperatur hatten, die höher als 39,8°C oder niedriger als 38,0°C lag, wurden nicht im Hauptversuch eingesetzt. Es wurden 1 ml der Probe/kg Körpergewicht langsam in die Ohrmandvene eines jeden Kaninchens injiziert. Die Injektionsdauer betrug höchstens 4 min. Als Maximaltemperatur wurde für jedes Kaninchen die höchste registrierte Temperatur in 30 drei Stunden nach der Injektion bestimmt. Die Temperatur eines jeden Kaninchens wurde in Abständen von höchstens 30 min aufgezeichnet, beginnend mindestens 90 min vor Verabreichung der Prüfsubstanz und 30 endend drei Stunden nach der Injektion. Die Differenz zwischen der Anfangstemperatur und der Maximaltemperatur eines jeden Kaninchens wurde als Ergebnis gewertet. Negative Differenzen wurden als Null gewertet.

## 35 Auswertung:

Zur Auswertung wurden die Temperaturdifferenzen summiert. Bei einer Gruppe von drei Kaninchen entspricht die Probe den Anforderungen, wenn die Summe der Einzelwerte kleiner als 1,15°C ist. Ist die Summe größer als 2,65°C, so entspricht die Probe nicht den Anforderungen.

Bei Ergebnissen, die zwischen den beiden oben genannten Werten liegen, muß der Test wie oben 40 beschrieben wiederholt werden. Es wurden maximal drei Wiederholungen durchgeführt.

Zur Auswertung nach Wiederholungen wurden alle getesteten Tiere (3, 6, 9 oder maximal 12) herangezogen. Die Prüfkriterien sind in der folgenden Tabelle enthalten:

Anzahl Kaninchen	Die Substanz entspricht der Prüfung auf Pyrogenfreiheit, wenn die Summe der Einzelwerte kleiner ist als	Die Substanz entspricht nicht der Prüfung, wenn die Summe der Einzelwerte größer ist als	
3	1,15°	2,65°	15
6	2,80°	4,30°	
9	4,45°	5,59°	
12	6,60°	6,60°	20

Die Probe entspricht den Prüfungserfordernissen, wenn die Summe der drei Einzelwerte kleiner als 1,15°C ist, oder bei Wiederholung die in der obigen Tabelle angeführten Bedingungen erfüllt.

Die erhaltenen Ergebnisse bei dem geprüften M2-Flagellenimpfstoff nach Injektion von 1 ml/kg Kaninchen bei individuellen  $\Delta t$ -Werten von drei Kaninchen waren die folgenden:

Impfstoffkonzentration

10 µg/ml	0,1°	0,1°	0,3°	$\sum \Delta t$ 0,5°c	30
10 µg/ml	0,3°	0,4°	0,2°	$\sum \Delta t$ 0,9°c	
20 µg/ml	0,3°	0,5°	0,2°	$\sum \Delta t$ 1,0°c	35
20 µg/ml	0,2°	0,1°	0,2°	$\sum \Delta t$ 0,5°c	
20 µg/ml	0,1°	0,4°	0,2°	$\sum \Delta t$ 0,7°c	40

Die geprüfte Präparation ist somit als frei von pyrogenen Substanzen anzusprechen.

Beispiel 5:

Isolierung der IgG-Fraktion aus Maus-Hyperimmunplasma zur Verwendung bei passiver Immunisierung  
 Plasma von mit protektivem Flagella(H)-Antigen des Typs M-2 immunisierten Mäusen wurde gesammelt, 30 min bei 56°C unter Schütteln erhitzt, um Fibrin auszufällen. Nach Zentrifugieren während 30 min bei 10.000 x g wurde durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 25 % (w/v) eine Fällung durchgeführt. Die Suspension wurde 20 min gerührt und 1 Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Hierauf wurde die Suspension während 30 min bei 10.000 x g zentrifugiert und einmal mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Die Fällung wurde in 10 mM Na-Phosphat-Puffer, pH-Wert 7,5, 50 mM NaCl, gelöst und anschließend über Nacht gegen diesen Puffer dialysiert. Nach Zentrifugation wurde eine Ionenaustauschchromatographie (DE-52 Cellulose (Whatman)) durchgeführt. Der Durchlauf enthielt Immunglobulin-G (IgG). Nach Austestung auf IgG wurde die Lösung auf das Ausgangsvolumen mit einer Amicon-Zelle konzentriert und über Nacht gegen eine 0,9 %ige NaCl-Lösung dialysiert. Anschließend wurde eine Gelchromatographie mit Sephadex G-200 durchgeführt. Die IgG-positiven Fraktionen wurden unter Verwendung einer Amicon-Zelle auf das Ausgangsvolumen aufkonzentriert.

Dieses Verfahren stellt eine Modifikation der von D.M.Weir in Edition Handbook of Experimental Immunology, 3rd Edition 1978, Chapter VII, VIII beschriebenen Methode dar.

Im Rahmen der Herstellung von gegen Flagella Antigene der Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* monospezifisch wirksamen Immunglobuline können jedoch auch andere bekannte Methoden außer der Ammonsulfatfällung herangezogen werden, z.B. eine DEAE-Chromatographie, eine Protein A-Affinitätschromatographie oder kombinierte Methoden, die dem Fachmann bekannt sind. Die Immunglobulin G-Präparationen können durch immunaffinitätschromatographische Arbeitsweisen zu monospezifischen Immunglobulinen

wieder weitergereinigt werden.

Für die Präparation der monospezifischen Immunglobuline wird mit Vorteil als Immunosorbens ein Trägermedium - vorzugsweise Sepharose 4B - verwendet, woran gereinigtes Flagellenantigen in monomerer oder polymerer Form kovalent gebunden ist.

Die IgG-hältige Lösung kann sodann mit einer Flußrate von vorzugsweise 1 bis 2 Säulenvolumina pro Stunde über das Affinitätsharz gepumpt werden. Nach dem Waschen des Harzes mit Pufferlösungen höherer Ionenstärken (z.B. 0,5 M NaCl) können die flagellenspezifischen Antikörper durch pH-Änderung oder chaotrope Agentien (z.B. 3M  $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) vom Gel eluiert werden.

Die Wirksamkeit von erfindungsgemäßen protektiven Antigenen und Antikörpern ist im folgenden dargestellt:

Der Nachweis der protektiven Wirksamkeit von erfindungsgemäß für Vakzine zu verwendenden Antigenen erfolgt durch den Nachweis von Flagella(H)-Antikörpern im Serum von Personen, die eine Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* erlitten haben.

Zur Konzentrationsbestimmung von anti-Flagella Antikörpern wird ein Immunabsorbent Assay, u.zw. ein "Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay" (ELISA) oder Radio Immunoassay (RIA) verwendet. Die erfindungsgemäß beschriebenen, hochgereinigten Flagella(H)-Antigene werden mit einem starken Detergens depolymerisiert, anschließend über unspezifische Wechselwirkung an eine Kunststoffoberfläche gebunden und mit Proben von Humanserum in Kontakt gebracht. Befinden sich im Humanserum anti-Flagella(H)-Antikörper, so binden diese spezifisch an das auf der festen Phase immobilisierte Antigen. Mit einem markierten anti-HumanIgG-Antikörper werden auf der Kunststoffoberfläche gebildete Flagella(H)-Antigen-Antikörperkomplexe nachgewiesen.

Dieses Verfahren läßt sich leicht quantitativ auswerten. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse eines Screenings von Serumproben auf Antikörper gegen verschiedene Flagella-Serotypen.



Tabelle 3  
Flagella(H)-Antikörpertiter in Humansenen

Pseudomonas aeruginosa-		M2		1210		5939		5940		5142		170018	
Stamm		b		a0a1a2		a0a3		a0a2		a0		a0a3a4	
H-Serotyp													
Serum #													
1		-		-		+		-		-		+	
2		(++)		(++)		+++		+		+		+++	
3		++		+++		+++		+++		++		+++	
4		-		-		-		-		-		-	
5		+		(++)		++		+		-		+	
6		++		-		(++)		-		+		-	
7		-		-		-		-		-		-	
8		-		-		++		-		-		++	
9		-		-		-		-		-		-	
10		-		+		+		+		-		+	
11		-		-		-		-		-		-	
12		-		-		-		-		-		-	
13		-		+		(++)		(++)		-		++	
14		+		-		-		-		+		-	
15		+		+		+		+		+		++	
-		keine Antikörper nachweisbar		++		Titer > 1 : 100		+++		Titer > 1 : 300			
(++)		knapp über der Nachweisgrenze		+++		Titer > 1 : 200							
+		Titer > 1 : 20		> 1 : 100									

Durch die in Tabelle 3 angeführten Ergebnisse über die Auffindung von Flagella(H)-Antikörpern in Seren v n nach dem Zufallsprinzip ausgewählten Spendern ist die Immunogenität von nativen Pseudomonas aeruginosa

Flagella(H)-Antigenen demonstriert.

Antikörper initiieren die Abwehr von in den Körper eingedrungenen Fremdorganismen in verschiedener Weise. Zusammen mit dem humoralen Abwehrsystem (Komplementsystem) werden von Antikörpern bekannte Fremdorganismen in einer Aufeinanderfolge von Reaktionen durch Lyse abgetötet. Weiterhin können an den Fremdorganismus gebundene Antikörper im Zusammenwirken mit Bestandteilen des Komplementsystems die Aufnahme (Phagozytose) des Fremdorganismus in die Abwehrzellen des Immunsystems (z.B. Granulocyten) induzieren. Im Inneren der Granulocyten kommt es üblicherweise zu einer Abtötung der phagozytierten Fremdzelle.

Im Falle flagellentragender Bakterien kann eine Schutzwirkung von Antikörpern, die gegen den Bewegungsapparat der Zelle gerichtet sind, auch auf die Hemmung der Motilität und damit der Ausbreitung eines Infektionsherdes zurückgeführt werden.

Die Motilitätshemmung durch Flagella(H)-Antikörper kann dadurch demonstriert werden, daß Flagella(H)-Antigene der in Tabelle 1 aufgeführten Serotypen zur Immunisierung von Mäusen verwendet und das so gewonnene anti-Flagella(H)-Serum bei Motilitäts-Hemmversuchen eingesetzt wird. Mit Antiserum getränkte Filterpapierringe werden auf Motilitäts-Agarplatten gelegt und der Agar innerhalb dieser Ringe mit einer Suspension des homologen Pseudomonasstammes beimpft. Die Zellmenge, die nach 24 h Inkubation außerhalb des Filterpapierringes sichtbar wird, dient als Maß für die Beurteilung der Motilitätshemmung. Die Ergebnisse der Tabelle 4 zeigen, daß mit Flagella(H)-Antigenen gewonnene Maus-Antisera die Motilität des homologen Pseudomonas Bakterienstammes hemmen.

Tabelle 4

Motilitätshemmung bei verschiedenen Mengen an homologem Antiflagellenserum

Stamm	homologes Antiflagellenserum ( $\mu$ l Serum/ $\mu$ l Keimsuspension*)			
	30/5	20/10	10/10	5/10
M-2	-	-	+-	+-
1210	-	+	+	+
5939	-	-	-	-
5940	-	-	-	-
5142	-	+-	+-	+-
170018	-	+-	+-	+-

\* ) Keimsuspension  $10^3$  Keime/ml

- keine Zellen außerhalb des Filterpapierringes

+- Zellen nur an einigen Stellen außerhalb des Filterpapierringes

+ geringes Zellwachstum außerhalb des Filterpapierringes

++ deutliches Zellwachstum außerhalb des Filterpapierringes

mit normalem Mausserum immer deutliches Zellwachstum (++)

Durch die Hemmung der Motilität der in einem Infektionsherd befindlichen Bakterien wird zwar deren weitere Ausbreitung nach der Kolonisierung im Körper des Patienten verhindert, die im Herd befindlichen Bakterien bleiben jedoch weiterhin in der Lage, den Organismus des Patienten durch Abgabe z.B. von

T xinen, Proteasen, tc. zu belasten. Ein echter Schutz gegen Infektion ist nur dann gewährleistet, wenn die bei der aktiven Immunisierung gebildeten Antikörper zu einer schnellen Abtötung der eingedrungenen Bakterien führen.

Im folgenden wird der Nachweis geliefert, daß Flagella(H)-Antikörper Phagocytose und intrazelluläre Abtötung des homologen *Pseudomonas* Bakterienstammes induzieren.

Zum Phagocytosetest wurden ein in Tabelle 3 nicht aufgeführtes Serum (# 16) sowie die Sera # 3 und # 5 mit einer flagellenlosen (fla-) Mutante des *Pseudomonas aeruginosa* Stammes M-2 (Montie, T.C., D. Doyle-Huntzinger, R.C. Craven, and I.A. Holder (1982) Infect. Immun. 38, 1296-1298) vorinkubiert, um alle nicht Flagellaspezifischen Antikörper aus den Sera zu entfernen. Isolierte Humangranulocyten wurden zur Bestimmung der intrazellulären Abtötung von *Pseudomonas aeruginosa* M-2 und der isogenen flagellenlosen Mutante in unbehandeltem und in vorabsorbiertem Serum eingesetzt. Die in Tabelle 5 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß Flagella(H)-Antikörper die Phagocytose und die darauffolgende intrazelluläre Abtötung des flagellentragenden Stammes von *Pseudomonas aeruginosa* induzieren, und damit im Sinne der Erfindung eine Schutzwirkung gegen Infektionen mit diesem Keim haben.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabelle 5

Phagocytose und intrazelluläre Abtötung von *Pseudomonas aeruginosa* M-2 und einer isogenen flagellenlosen Mutante

Serum#	Verdünnung	Intrazelluläre Abtötung		Pseudomonas aeruginosa M-2		Pseudomonas aeruginosa M-2 fla-	
		Serum		Serum ohne		Serum ohne	
		Serum	Serum abs.	Serum	Serum abs.	Serum	Serum abs.
				Granulocyten		Granulocyten	
3	1 : 25	94 %	59 %	n.b.	92 %	0 %	n.b.
	1 : 100	52 %	24 %	n.b.	36 %	0 %	n.b.
	1 : 250	19 %	13 %	n.b.	16 %	3 %	n.b.
5	1 : 25	95 %	51 %	0 %	92 %	1 %	0 %
	1 : 100	72 %	29 %	0 %	58 %	2 %	0 %
	1 : 250	35 %	25 %	0 %	21 %	0 %	0 %
16	1 : 25	95 %	57 %	0 %	93 %	0 %	0 %
	1 : 100	78 %	24 %	n.b.	70 %	0 %	n.b.
	1 : 250	5 %	0 %	n.b.	10 %	0 %	n.b.

Der direkte Nachweis der Schutzwirkung von Antigenen, die zu aktiver Immunisierung verwendet werden sollen, kann nur im Tiermodell geführt werden. Um die Situationen zu simulieren, die Patienten für

Pseudomonas-Infektionen prädisponieren, fanden zwei in der Literatur beschriebene Tiermodelle Verwendung: das burned mouse Modell (Stieritz, D.D., and I.A. Holder (1975) J. Infect. Dis. 131, 688-691) und das Endoxan Modell (Cryz, S.J.Jr., Fürer, E., Germanier, R. (1983) Infect. Immunity 40, 659-664).

Für beide Modelle wurden die LD<sub>50</sub> Dosis von *Pseudomonas aeruginosa* in nicht immunisierten Tieren ermittelt, die im Falle des Endoxan Modells immunsupprimiert wurden; beim burned mouse Modell wurde eine Verbrennung definierter Größe gesetzt. Nach der Immunisierung mit den in Tabelle 6 angeführten Flagella(H)-Antigenen wurden Tiere mit Verbrennungen bzw. immunsupprimierte Tiere mit einem Vielfachen der vorher ermittelten LD<sub>50</sub> Keimzahl des homologen *Pseudomonas*-Stammes infiziert. Tabelle 6 zeigt die Vielfachen der LD<sub>50</sub> Keimzahlen, die von 100 % der mit der angegebenen Konzentration von Antigen immunisierten Tiere im Endoxan- und im burned mouse-Modell toleriert werden.

Tabelle 7 zeigt die Abhängigkeit der Schutzwirkung des M-2 Flagella-Antigens. In diesem Fall wurden die Tiere mit steigenden Mengen von M-2 Antigen immunisiert und in beiden Modellen getestet. In beiden Fällen ist eine eindeutige Dosisabhängigkeit der Schutzwirkung des zur Immunisierung verwendeten M-2 Flagella-Antigens zu erkennen.

Tabelle 6  
Aktive Schutzversuche mit *Pseudomonas aeruginosa* Flagelle(H)-Antigenen

Antigen	Menge/Maus adjuvantiert mit AL(OH) <sub>3</sub>	Immunisierung Tage vor Chall.	Endoxanmodell x LD <sub>50</sub>	Burned mouse Modell x LD <sub>50</sub>
M-2	1 µg	14	10	>10 <sup>3</sup>
	3 µg	14	30	>10 <sup>4</sup>
	3 µg	14 + 7	30	>10 <sup>4</sup>
1210	3 µg	14 + 7	30	>10 <sup>4</sup>
M-2 + 1210	je 1,5 µg	14	10 <sup>2</sup> M-2 10 1210	>10 <sup>4</sup> M-2 >10 <sup>4</sup> 1210
Polyva- lent (6 Typen)	je 3 µg	14 + 7	10 <sup>2</sup> M-2 10 1210	10 <sup>4</sup> M-2 10 <sup>4</sup> 1210

## Tabelle 7

### Dosisabhängigkeit der Schutzwirkung des M-2 Flagella(H)-Antigens

Zahl der Challenge- Keime (x LD50)	Zahl der überlebenden Tiere: a) Endoxanmodell b) burned mouse Modell											
	3 µg		1 µg		0,3 µg		0,1 µg		0,03 µg		0,01 µg	
	a)	b)	a)	b)	a)	b)	a)	b)	a)	b)	a)	b)
10	100%	80%	89%	90%	100%	90%	89%	40%	100%	60%	70%	78%
30	100%	80%	100%	30%	90%	20%	80%	10%	50%	20%	40%	20%
100	80%	60%	90%	20%	90%	10%	90%	0%	100%	0%	30%	20%
300	90%	50%	90%	10%	100%	0%	90%	10%	80%	20%	20%	0%
1000	100%	30%	100%	20%	70%	0%	100%	10%	90%	20%	20%	0%

Der direkte Nachweis der Schutzwirkung von Antikörpern, die zu passiver Immunisierung verwendet werden sollen, kann nur im Tiermodell geführt werden. Um eine der Situationen zu simulieren, die Patienten für

Pseudomonas-Infektionen prädisponieren, fand das in der Literatur beschriebene Endoxan-Modell (Cryz, S.J.Jr., Fürer, E., Germanier, R. 1983: Passive Protection Against Pseudomonas aeruginosa Infection in an Experimental Leukopenic Mouse Model. Infect. Immunity 40, 659-664) Verwendung.

In diesem Test wird die LD<sub>50</sub> Dosis von Pseudomonas aeruginosa Keimen in immunsupprimierten Tieren ermittelt; im Falle des hier beschriebenen Experiments lag diese bei  $9,5 \times 10^2$  Keimen. Zwei Stunden nach der passiven Immunisierung mit einem Maus anti-Pseudomonas aeruginosa M-2 Hyperimmunplasma, für das im Antikörper-ELISA eine Titerstufe von 1 : 1600 bestimmt wurde, werden die immunsupprimierten Tiere mit einem Vielfachen der vorher ermittelten LD<sub>50</sub>-Keimzahl des homologen Pseudomonas-Stammes infiziert.

Tabelle 8 zeigt, daß passiv immunisierte Tiere bis zu einer 30-fachen LD<sub>50</sub> Dosis des Challenge Keims geschützt sind.



Tabelle 8  
Passiver Pseudomonas-Schutzversuch

Inoculum 2 Stunden von In- fektion	E n d o x a n m o d e l l	
	Zahl der Überlebenden Tiere nach 3 Tagen (Zahl der Tiere im Versuch)	0,1 ml Hyperimmunplasma i.v.
3 LD <sub>50</sub> von M-2	0 (10)	9 (10)
10 LD <sub>50</sub> von M-2	0 (10)	8 (10)
30 LD <sub>50</sub> von M-2	0 (10)	6 (10)
100 LD <sub>50</sub> von M-2	0 (10)	0 (10)
300 LD <sub>50</sub> von M-2	0 (10)	0 (10)

# **Patentanspruch**

1. Gegen *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen wirksame Vakzine, dadurch gekennzeichnet, daß sie protektive Flagella(H)-Antigene vom H-Serotyp a bzw. b enthalten, welche aus monomeren Bestandteilen bestehen, wobei jeder monomere Bestandteil

a) folgende Aminosäuren: Asparaginsäure (Asp), Threonin (Thr), Serin (Ser), Glutaminsäure (Glu), Glycin (Gly), Alanin (Ala), Valin (Val), Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Tyrosin (Tyr), Phenylalanin (Phe), Lysin (Lys), Arginin (Arg) und gegebenenfalls Tryptophan (Trp) und Methionin (Met) enthält,

b) die N-terminale Aminosäuresequenz Alanin (Ala) -Leucin (Leu) - Threonin (Thr) - Valin (Val) -Asparagin (Asn) - Threonin (Thr) - Asparagin (Asn) -Isoleucin (Ile) - Alanin (Ala) - aufweist,

c) ein Molekulargewicht zwischen 43.500 und 53.050 aufweist und

d) frei ist von Prolin, Halb-Cystin und Histidin und daß sie frei sind von pyrogenen Substanzen.

2. Vakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie Flagella(H)-Antigene vom H-Serotyp a<sub>0</sub>, a<sub>3</sub> und a<sub>4</sub> enthalten, welche Antigene aus monomeren Bestandteilen bestehen, die die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 64 : 33 : 35 : 42 : 44 : 68 : 29 : 29 : 37 : 3 : 10 : 19 : 15 enthalten und ein Molekulargewicht von 43.500 aufweisen.

3. Vakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie Flagella(H)-Antigene vom H-Serotyp a<sub>0</sub>, a<sub>3</sub> enthalten, welche Antigene aus monomeren Bestandteilen bestehen, die die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 69 : 35 : 38 : 44 : 47 : 73 : 30 : 30 : 60 : 3 : 12 : 21 : 16 enthalten und ein Molekulargewicht von 46.700 aufweisen.

4. Vakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie Flagella(H)-Antigene vom H-Serotyp a<sub>0</sub> enthalten, welche Antigene aus monomeren Bestandteilen bestehen, die die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 74 : 50 : 49 : 49 : 89 : 37 : 29 : 44 : 5 : 14 : 17 : 16 enthalten und ein Molekulargewicht von 52.720 aufweisen.

5. Vakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie Flagella(H)-Antigene vom H-Serotyp b enthalten, welche Antigene aus monomeren Bestandteilen bestehen, die die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 74 : 48 : 49 : 51 : 91 : 38 : 30 : 43 : 4 : 13 : 18 : 18 enthalten und ein Molekulargewicht von 53.050 aufweisen.

6. Vakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie Flagella(H)-Antigene vom H-Serotyp a<sub>0</sub>, a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub> enthalten, welche Antigene aus monomere Bestandteilen bestehen, die die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 76 : 44 : 40 : 52 : 50 : 81 : 32 : 32 : 41 : 4 : 12 : 20 : 18 enthalten und ein Molekulargewicht von 51.250 aufweisen.

7. Vakziné nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie Flagella(H)-Antigene vom H-Serotyp a<sub>0</sub>, a<sub>2</sub> enthalten, welche Antigene aus monomeren Bestandteilen bestehen, die die Aminosäuren: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin im Verhältnis 68 : 41 : 37 : 46 : 44 : 73 : 29 : 29 : 37 : 3 : 10 : 16 : 16 enthalten und ein Molekulargewicht von 45.900 aufweisen.

8. Verfahren zur Herstellung von Vakzinen gemäß den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein aus Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa* gewonnenes, gereinigtes Flagella(H)-Antigen sterilfiltriert, gegebenenfalls mit einem Adjuvans, wie Al(OH)<sub>3</sub> vermischt, gewünschtenfalls mit einem Präservans, wie Merthiolat, versetzt und in eine galenische Zubereitung formuliert wird.

9. Immunglobulin G-hältige, gegen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen wirksame Präparationen zur prophylaktischen und therapeutischen Anwendung, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus dem Blutplasma von mit protektiven Flagella(H)-Antigenen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 immunisierten menschlichen Spendern bzw. Säugetieren gewonnene Flagella(H)-Antikörper enthalten.

10. Präparationen nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie Flagella(H)-Antikörper mit einer motilitätshemmenden Wirkung sowie mit der Fähigkeit einer erhöhten Phagocytose und einer erhöhten intrazellulären Abtötung von *Pseudomonas aeruginosa*-Bakterien aufweisen.

11. Verfahren zur Herstellung von Immunglobulin G-hältigen, gegen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen wirksame Präparationen gemäß den Ansprüchen 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß Plasma von mit protektiven Flagella(H)-Antigenen immunisierten menschlichen Spendern bzw. Säugetieren mit Proteinfällungsmittel In, wie Ammoniumsulfat, behandelt, die ausgefällte Immunglobulin G-hältige Fraktion gelöst und gereinigt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Reinigung der Immunglobulin G-hältigen Fraktion durchgeführt wird, indem die Lösung über ein Trägermedium geleitet wird, an welchem gereinigtes Flagella-Antigen in monomerer oder polymerer Form kovalent gebunden ist, die flagellenspezifischen Antikörper durch pH-Änderung oder chaotrope Agentien, wie NH<sub>4</sub>SCN, vom Gel

**0 252 064**

eluiert und in eine galenische Zubereitung formuliert werden.

**5**

**10**

**15**

**20**

**25**

**30**

**35**

**40**

**45**

**50**

**55**

**60**

**65**



19



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

11

Veröffentlichungsnummer:

**0 252 064  
A3**

12

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21

Anmeldenummer: 87890135.4

51

Int. Cl. 4: **A61K 39/104 , A61K 39/40**

22

Anmeldetag: 15.06.87

30

Priorität: 24.06.86 AT 1716/86

43

Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
07.01.88 Patentblatt 88/01

84

Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB IT LI LU NL SE

88

Veröffentlichungstag des später veröffentlichten  
Recherchenberichts: 15.03.89 Patentblatt 89/11

71

Anmelder: IMMUNO Aktiengesellschaft für  
chemisch-medizinische Produkte  
Industriestrasse 72  
A-1220 Wien(AT)

72

Erfinder: Dörner, Friedrich, Prof. Dr.  
Peterlinigasse 17  
A-1230 Wien(AT)  
Erfinder: Eibl, Johann, Dr.  
Gustav Tschermakgasse 2  
A-1180 Wien(AT)

74

Vertreter: Wolfram, Gustav, Dipl.-Ing.  
Schwindgasse 7 P.O. Box 205  
A-1041 Wien(AT)

54

Gegen *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen wirksame Präparationen und Verfahren zu ihrer Herstellung.

57

Es werden gegen *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen wirksame Präparationen, u.zw. Vakzine zur aktiven Immunisierung sowie Antikörper enthaltende, zum passiven Schutz bestimmte Präparationen und Verfahren zu deren Herstellung beschrieben.

Die Vakzine enthalten protektive Flagella(H)-Antigene vom H-Serotyp a und b, welche aus monomeren Bestandteilen bestehen, jeder monomere Bestandteil aus bestimmten Aminosäuren mit einer bestimmten N-terminalen Aminosäuresequenz aufgebaut ist und ein bestimmtes Molekulargewicht aufweist. Die Vakzine werden aus gereinigten Flagella(H)-Antigen-Lösungen hergestellt. Die Immunglobulin G-hältigen Präparationen enthalten aus dem Blutplasma von mit protektiven Flagella(H)-Antigenen immunisierten menschlichen Spendern bzw. Säugetieren gewonnene Flagella(H)-Antikörper. Sie können durch Affinitätschromatographische Verfahren gereinigt werden.

EP 0 252 064 A3



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 87 89 0135

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
X, P D	WO-A-8 603 974 (IMMUNO AG) * Insgesamt * ----	1-12	A 61 K 39/104 A 61 K 39/40
A	ABSTRACTS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, Band 85, Nr. 0, 1985, Seite 12, Nr. A69; I.A. HOLDER et al.: "Immunization using divalent Flagella preparations: protection of burned, Pseudomonas aeruginosa infected mice" * Zusammenfassung * ----	1-12	
A	ABSTRACTS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, Band 85, Nr. 0, 1985, Seite 42, Nr. B143; D. DRAKE et al.: "Passive protection with Flagellar antiserum against Pseudomonas aeruginosa infection in compromised mice" * Zusammenfassung * ----	1-12	
A	ABSTRACTS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, Band 81, 1981, Seite 17, Nr. B17; T.C. MONTIE et al.: "Protection of burned, Pseudomonas infected mice using Flagellar preparations" * Zusammenfassung * ----	1-12	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)  A 61 K
A	INFECTION AND IMMUNITY, Band 35, Nr. 1, Januar 1982, Seiten 276-288; T.C. MONTIE et al.: "Flagellar preparations from Pseudomonas aeruginosa: Isolation and characterization" * Seite 281, Zusammenfassung; Seite 283, Spalte 1, Zeilen 1-9; Seite 287, Spalte 2, Zeilen 30-40 * ----- -/-	1-12	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 18-11-1988	Prüfer FERNANDEZ Y BRANAS F.J.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument ----- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
A	INFECTION AND IMMUNITY, Band 49, Nr. 3, September 1985, Seiten 770-774; J.S. ALLISON et al.: "Electrophoretic separation and molecular weight characterization of Pseudomonas aeruginosa H-antigen flagellins" * Insgesamt * ----	1-12	
A	INFECTION AND IMMUNITY, Band 35, Nr. 1, Januar 1982, Seiten 276-280; I.A. HOLDER et al.: "Flagellar preparations from Pseudomonas aeruginosa: Animal protection studies" * Insgesamt * -----	1-12	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 18-11-1988	Prüfer FERNANDEZ Y BRANAS F.J.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument ----- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**